

B型肝炎ウイルスキャリアーにおける血中HBV-DNAの存在様式の検討

著者	山田 美樹
号	2695
発行年	1994
URL	http://hdl.handle.net/10097/21127

氏 名（本籍） やま だ み き
山 田 美 樹

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 2 6 9 5 号

学位授与年月日 平 成 6 年 9 月 7 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 16 日
岩手医科大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 B 型肝炎ウイルスキャリアーにおける血中
HBV-DNA の存在様式の検討

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 豊 田 隆 謙 教授 大 槻 昌 夫

教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

【背景】

B型肝炎ウイルス（HBV）は球形粒子（Dane粒子）として血中に存在し、外殻（エンベロープ）と内部の芯（コア）からなっており、コア内部に長鎖（マイナス鎖）と短鎖（プラス鎖）からなる環状二重鎖DNAを内在している。肝内で増殖するHBVは、DNA合成のいずれかの過程で外殻により被包され、Dane粒子として血中に放出される。血中HBV中のDNA（HBV-DNA）の存在様式に関してはサザンブロット法により検討がなされ、血中HBVの異種性とB型肝炎の病態との関連が考えられるが、現在までこの異種性の生じる背景は明らかにされていない。

【目的】

血中HBVの存在様式の分類を試み、各型の分子生物学的解析とB型肝炎の臨床像との関連を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

対象はHepatitis B e（HBe）抗原陽性HBVキャリアー43例：男性37例，女性6例を対象とした。その内訳は，無症候性HBVキャリアー（ASC）6例，非特異的反応性肝炎（NSRH）7例，慢性持続性肝炎（CPH）9例，慢性活動性肝炎（CAH）16例（CAH 2A 9例，CAH 2B 7例），肝硬変（LC）5例である。血中HBV関連マーカー（HBs抗原，HBe抗原）はラジオイムノアッセイ法，エンザイムイムノアッセイ法で測定した。HBV-DNAポリメラーゼ活性は，Kaplanらの方法に従って測定した。血中HBV-DNAの定量は，ビオチン及び³²P標識プローベを用いたスポットハイブリダイゼーション法で行った。血中HBV-DNAは，ビチオン標識プローベを用いたサザンブロット法で分類し，さらに内因性ポリメラーゼ反応及び制限酵素処理を行い分子生物学的に解析した。肝組織内HBc抗原は，生検肝を用いアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体法で染色した。

【結果】

① スポットハイブリダイゼーション法による血中HBV-DNAの定量

ビオチン標識プローベを用いたスポットハイブリダイゼーション法では，DNA濃度の上昇につれてスポット強度の上昇を認めた。一方，³²P標識プローベを用いた場合は，DNA濃度の上昇とともにスポットサイズが上昇した。ビオチン標識プローベを用いたスポットハイブリダイゼー

ション法で血中 HBV-DNA 濃度を ± 5 までの 6 段階で半定量した。

② サザンブロット法による血中 HBV-DNA の検討と分子生物学的解析

ビオチン標識プローベを用いたサザンブロット法で血中 HBV-DNA を以下の 3 型に分類した。Type I : 4.0kb と 3.2kb の 2 つの明瞭なバンドを認めるもの。Type II : 4.0kb と 3.2kb のバンド及びその両バンド間のスメアーを認めるもの。Type III : 4.0kb 以下の広いバンドのみを認めるもの。内因性ポリメラーゼ反応及び制限酵素処理を行いバンドを解析することにより、4.0kb のバンドは環状完全二重鎖 HBV-DNA、3.2kb のバンドは直鎖状完全二重鎖 HBV-DNA、4.0kb 以下のスメアーは環状不完全二重鎖 HBV-DNA であることが証明された。

③ HBV-DNA 濃度と HBV-DNA ポリメラーゼ活性の比較

HBV-DNA 濃度に対する HBV-DNA ポリメラーゼ活性の平均値は、Type III で最も高く、Type I で最も低い値を示した。

④ 各 Type と臨床像との関係

HBV キャリアー 43 例を、サザンブロット法で 3 群 (I 群 : Type I の 18 例, II 群 : Type II の 17 例, III 群 : Type III の 8 例) に分類した。肝機能検査上、血清トランスアミナーゼ (AST, ALT) 及び血清膠質反応 (ZTT, TTT) は、I 群に比し II, III 群で有意に高かった ($p < 0.001$, ANOVA test)。病理組織学的には、I 群は ASC, NSRH という軽微な炎症像を示した。一方、II, III 群は全例 CPH, CAH, LC という炎症の高度な症例あるいは組織学的に進行した症例であった ($p < 0.001$, χ^2 test)。肝細胞内 HBc 抗原は、Type I の 75% は核のみに染色されたのに対し、Type II, III では全例核と細胞質に染色された。特に Type III では、細胞質優位に染色された ($p < 0.001$, χ^2 test)。血中 HBV-DNA は、ALT 正常期には Type I を示し、ALT の上昇とその持続とともに Type II から Type III へと経時的に変化した。

【考 案】

ビオチン標識プローベを用いたサザンブロット法で血中 HBV-DNA を 3 型に分類した。3 型の差は、DNA 濃度の差ではなく、質的差であることが明らかとなった。

【結 語】

血中 HBV 中の存在様式を 3 型に分類し、各型の分子生物学的解析と B 型肝炎の臨床像との関連を検討した。本法による分類は、肝炎の程度と予後を知る上で有用な指標であると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

肝内で増殖し血中に放出される HBV は、内部に環状二重鎖 DNA を内在している。血中 HBV-DNA の存在様式に関しては、一定の見解が得られておらず、血中 HBV の異種性と B 型肝炎の病態との関連が考えられるが、現在までこの異種性の生じる背景は明らかにされていない。本論文は、HBV キャリアー血清中の HBV-DNA をサザンブロットハイブリダイゼーション法により解析し、HBV-DNA の存在様式と B 型肝炎の臨床像との関連を検討したものである。論文では、血中 HBV-DNA をサザンブロットパターンにより 3 型に分類している。分類に際し、サザンブロットパターンの HBV-DNA 濃度による影響を検討するために、DNA 濃度を 2 倍希釈系列で希釈し同様のサザンブロットハイブリダイゼーションを行うことにより、至適 DNA 濃度の決定と各型は DNA 濃度の差ではないことを証明している。さらに、内因性ポリメラーゼ反応及び制限酵素処理という分子生物学的手法により HBV の分子種の同定を行い、3 型の差は、バンドを構成する HBV の異種性に起因する質的差であることを明らかとしている。

HBV-DNA の存在様式と B 型肝炎の臨床像との関連では、HBV キャリアーを対象にサザンブロット法で分類した 3 群について、各群の肝機能検査値、病理組織学的診断及び肝細胞内 HBc 抗原の局在について検討し、統計学的に有意な差をもって肝細胞障害の程度と密接な関わりがあると結論している。同様の結果は、同一症例の経時的観察によっても確認されている。しかし、この異種性が肝細胞障害を引き起こしているのか、あるいは HBV の増殖の場である肝細胞への炎症の波及が HBV の肝内増殖及び血中放出過程に何らかの影響を及ぼし、結果的に血中 HBV の異種性を生じさせているのかは不明であり、今後明らかにしなければならない点と考えられる。

本論文は、サザンブロット法による血中 HBV-DNA の存在様式の分類を確立し、その差が量的差ではなく、質的差であることを明らかとしている点及び B 型肝炎の病態との関連において、血中レベルで肝細胞障害の程度と B 型肝炎の予後を知りうる有用な指標であるという新しい知見を得ており、学位に十分値するものと評価される。